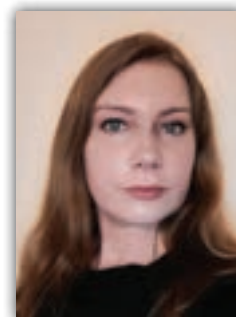


# Utjecaj zagađivača iz okoliša na endokrину funkciju žaba



## The influence of environmental pollutants on the endocrine function of frogs

Delač, D., L. Pađen., J. Aladrović

### Sažetak

U Europi postoji oko 85 vrsta vodozemaca, podijeljenih u dva filogenetska reda: bezrepci (Anura) – žabe i krastače i repaši (Urodela, Caudata) – daždvenjaci i vodenjaci. Nažalost, većina vodozemaca bilježi pad brojnosti. Glavni su uzroci tomu gubitak i fragmentacija staništa, invazivne vrste, gljivične i virusne bolesti, klimatske promjene te kemijska zagađenja. Budući da endokrini sustav vodozemaca kontrolira vrlo složen proces metamorfoze, kemijski zagađivači koji uzrokuju endokrinološke poremećaje posebno su pogubni za vodozemce. Tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje najčešće se nalaze u pesticidima i gnojivima u poljoprivredi, nalaze se u kozmetici, doaze kao sredstva za čišćenje kućanstva te brojni industrijski nusproizvodi. Endokrinološke poremećaje uzrokuju atrazin, bisfenol A, ftalati i glifosat, koji su danas zabranjeni u Europskoj uniji, ali o čijoj upotrebi može odlučivati svaka država članica EU-a zasebno. Uspostavljena je banka poznatih tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje. Kako bi se smanjila količina tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje u okolišu, razvijene su i tehnike pročišćivanja otpadnih voda, poput ozonizacije, aplikacije aktivnog ugljena u filtere i upotreba mikroorganizama. Usprkos tomu, tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje i dalje dospijevaju u okoliš. U svrhu smanjenja onečišćenja okoliša, posljednja su dva desetljeća doneseni brojni zakoni i pravilnici, i u Europskoj uniji i u svijetu, kojima je cilj ograničiti ili zabraniti upotrebu kemijskih proizvoda koji uzrokuju endokrinološke poremećaje u vodozemaca. Cilj je rada dati kratki uvid u stanje europskih populacija vodozemaca s pregledom glavnih prijetnji njihovu zdravlju i opstanku, kao i opisati endokrini sustav vodozemaca, opisati tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje te zakonsku regulativu vezanu uz kemikalije koje djeluju štetno na endokrini sustav.

**Ključne riječi:** endocrine system, amphibians, endocrine disruption, chemical pollutants

### Abstract

There are about 85 species of amphibians in Europe, divided into two phylogenetic orders: *Anura* - frogs and toads; and *Urodela, Caudata* - salamanders and newts. Unfortunately, most amphibians are experiencing a decline in numbers. The main causes are habitat loss and fragmentation, invasive species, fungal and viral diseases, climate change and chemical pollution. Since the endocrine system of amphibians controls the very complex process of metamorphosis, chemical pollutants that cause endocrine disruption are particu-

Doris DELAČ, dr. med. vet., polaznica specijalističkog studija Patologija i uzgoj egzotičnih kućnih ljubimaca, Veterinarski fakultet u Zagrebu, dr. sc. Lana PAĐEN, dr. med. vet., izvanredna profesorica, Zavod za fiziologiju i radiobiologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, dr. sc. Jasna ALADROVIĆ, dr. med. vet., redovita profesorica u trajnome zvanju, Zavod za fiziologiju i radiobiologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Dopisna autorica lana.paden@vef.hr

larly harmful to amphibians. Substances that cause endocrine disruption most often originate from agriculture, cosmetics, household cleaning products and numerous industrial by-products. These include atrazine, bisphenol A, phthalates, which are now banned in the European Union, as well as numerous others, such as glyphosate, the use of which can be decided by each EU member state individually. To better detect them, a bank of known endocrine disruptors has been developed, and wastewater treatment techniques such as ozonation, together with the application of activated carbon in filters, and the use of microorganisms. Despite this, endocrine disruptors continue to enter the environment due to the illegal trade in agricultural chemicals. To reduce environmental pollution, numerous laws and regulations have been passed in the last two decades, both in the European Union and worldwide, with the aim of limiting or prohibiting the use of chemical products that induce endocrine disruption in amphibians. The aim of the paper is to provide a brief insight into the state of European amphibian populations with an overview of the main threats to their health and survival, as well as to describe the endocrine system of amphibians, describe substances that cause endocrine disruption, and legal regulations related to chemicals that have a harmful effect on the endocrine system.

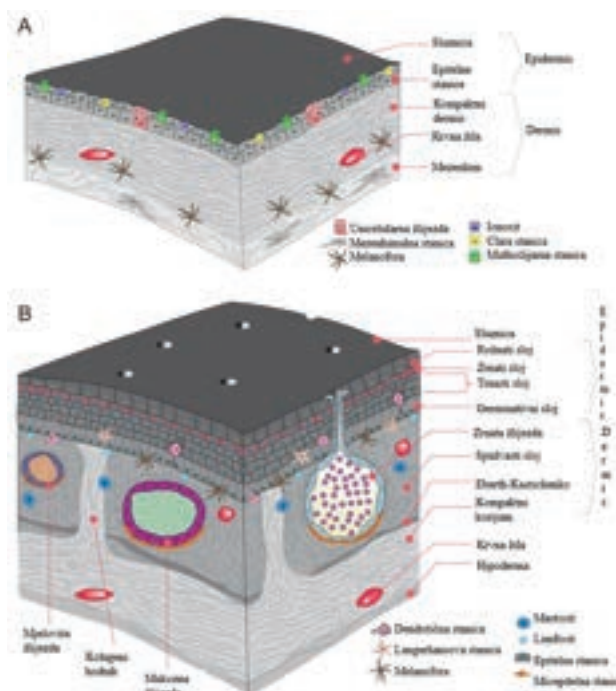
**Key words:** endokrini sustav, vodozemci, endokrinološki poremećaji, kemijski zagađivači

## Uvod

Populacije vodozemaca diljem svijeta u opadanju su, a uzroci su višestruki: uništavanje staništa i njegova fragmentacija, kemijski zagađivači u okolišu te unos invazivnih vrsta.

Zbog svoje jedinstvene fiziologije vodozemci su posebno osjetljivi na zagađenja iz okoliša te su dobar indikator općeg zdravlja ekosustava. Koža vodozemaca, za razliku od kože drugih kralježnjaka, vrlo je propusna i izravno uključena u niz važnih fizioloških procesa, kao što su disanje, osmoregulacija, termoregulacija, obrana, apsorpcija vode i komunikacija (slika 1). Epidermis odrasle jedinke sastoji se od slojevitog pločastog epitela i dermalnih žlijezda. Unutar epidermisa iznutra prema van nalaze se četiri sloja: germinativni sloj (*stratum germinativum*), trnasti sloj (*st. spinosum*), zrnasti sloj (*st. granulosum*) i oroženi sloj (*st. corneum*) (Akat i sur., 2022.). Tvrdi je sloj tanak i nastaje keratinizacijom. Epidermalna keratinizacija vodozemaca vitalna je za kožnu prilagodbu među vodenim organizmima, jer omogućuje osmoregulaciju, termoregulaciju i disanje, te kao zaštita od mehaničkih oštećenja (Akat i sur., 2022.). Koža vodozemaca sadržava peptide za koje je nedavno otkriveno da djeluju antimikrobno ili antioksidacijski, a ovo je otkriće dovelo do kliničkih istraživanja u zacjeljivanju rana, regeneraciji i proizvodnji bioaktivnih peptida u cijelom svijetu, kao sve većoj temi proučavanja. Keratinociti i granularne stanice povezane su čvrstim spojištima (Farquhar i Palade, 1965.; Akat Çömden i sur., 2023.). Za razliku od korneocita u koži amniota, oroženi sloj vodozemaca sastoji se od odumirućih keratinocita koji ovaj sloj čine vodopropusnim (Voute i Ussig, 1968.; Akat Çömden i sur., 2023.).

U kemijske zagađivače koji utječu na zdravlje vodozemaca ubrajaju se štetne tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje. Cilj je rada dati kratak uvid u stanje europskih populacija vodozemaca s pregledom glavnih prijetnji njihovu zdravlju i opstanku. Nadalje, cilj je rada također prikazati endokrini sustav vodozemaca, tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje s naglaskom na njihov utjecaj na zdravlje vodozemaca i ljudi te zakonsku regulativu vezanu uz kemikalije koje djeluju štetno na endokrini sustav.



Slika 1.

## Stanje europskih populacija vodozemaca i njihova ugroza

Vodozemci obuhvaćaju oko 4500 vrsta na svim kontinentima osim Antarktike i dijele se u tri reda: bezrepci (Anura, Salientia) – žabe i krastače (slika 2), repaši (Urodela, Caudata) – daždevnjaci (slika 3) i vodenjaci te beznošci (Apoda, Gymnophiona). Beznošci ne obitavaju u Europi te su uglavnom ograničeni na tropske krajeve (Zhang i Wake, 2009.).

Brojnost jedinki u populacijama vodozemaca u Europi i svijetu već je dulje vrijeme u opadanju. U Europi živi oko 85 vrsta, i to 58 vrsta žaba i 27 vrsta daždevnjaka i vodenjaka. Od tih 85 vrsta vodozemaca šest je vrsta ugroženo, a dvije su vrste kritično ugrožene. Osjetljivim ili potencijalno ugroženim smatra se 25 europskih vrsta vodozemaca (Temple i Cox, 2009.).

Primarni uzroci pada brojnosti vodozemaca u Europi jesu gubitak staništa, invazivne vrste, bolesti i kemijska onečišćenja (Becker i sur. 2007.; Trochet i sur., 2014.). Gubitak staništa povezan je s prenamjenom šuma i močvara u poljoprivredne površine, izgradnjom prometnica te širenjem urbanih sredina. Širenje poljoprivrednih površina dvostruko pridonosi smanjenju brojnosti populacija vodozemaca, smanjenjem staništa te štetnim učincima pesticida (Gallant i sur., 2007.). Izgradnja prometnica dovodi do fragmentacije staništa, što povećava rizik od stradavanja vodozemaca u prometu (slike 4.a, 4.b i 5), posebice produktivnog dijela populacije prilikom migracija u vrijeme razmnožavanja. Nadalje, poznato je da fragmentacija staništa dovodi do efekta genetskog „uskog grla“, smanjujući gensku raznolikost unutar izoliranih populacija (Andersen, 2004.).

Invazivne vrste, poput crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta*) i sjevernoameričkog bukača (*Lithobates catesbeianus*), natječu se s domicilnim vrstama za teritorij i hranu te djeluju kao vektori za razne patogene (Falaschi i sur., 2019.; Johovic i sur. 2020.). Većina vodozemaca ima kompleksan životni ciklus, akvatični i terestrijalni stadij, stoga se smatraju visokorizičnom skupinom, osjetljivom na unošenje bilo akvatične bilo terestrične faune u stanište. S druge strane, ponovno uvođenje nekih lokalno izumrlih vrsta, poput europskog dabra (*Castor fiber*), pozitivno je utjecalo na brojnost vodozemaca u tim područjima (Dalbeck i sur., 2020.).

Najvažnije bolesti koje su znatna prijetnja europskim vodozemcima, uzrokovane su ranavirusima i gljivicama *Batrachochytrium dendrobatidis* i *B. salamandrivorans* (Cunningham i sur., 2015.; Campbell i sur., 2020.). Ilegalna trgovina egzotičnim kućnim ljubimcima i njihovo puštanje u prirodu način su unošenja novih patogena u populacije europskih vodozemaca (Auliya i sur., 2016.).



Slika 2. Zelena krastača (*Bufo viridis*), čest stanovnik prigradskih naselja. D. Delač (Zagreb, 2021.).



Slika 3. Pjegavi daždevnjak (*Salamandra salamandra*). L. Paden (Zagreb, 2022.).

Dodatna su prijetnja i klimatske promjene koje ugrožavaju glacijalne relikte, poput planinskog vodenjaka (*Ichthyosaura alpestris*) i nekih vrsta krastača primalja iz porodice *Alytidae*, zbog smanjenja njihovih staništa (Sillero i sur., 2014.; Bernabò i sur., 2022.).

Kada govorimo o kemijskim zagađivačima, do vodozemaca dolaze primarno upotrebom gnojiva, fungicida, herbicida i drugih pesticida u intenzivnoj poljoprivredi. Kemijski se zagađivači u okoliš ispuštaju nepravilnom preradom industrijskih otpadnih voda, ali i kanalizacijskim gradskim vodama, koje tada najčešće sadržavaju niz kemikalija korištenih u kućanstvima, poput kozmetike ili sredstava za čišćenje (Brühl i sur., 2013., Trudeau i sur., 2020.). Mnoge od tih kemijskih tvari, kada se nađu u većim količinama u okolišu, uzrokuju endokrinološke poremećaje, među ostalim i negativno utječu na razmnožavanje i metamorfozu vodozemaca te tako dovode do naglog opadanja brojnosti populacija (Matthiessen, i sur., 2017.).



Slika 4a. Pjegavi daždevnjak (*Salamandra salamandra*). D. Delač (Stubičke Toplice, 2020.).



Slika 4a. Pjegavi daždevnjak (*Salamandra salamandra*). D. Delač (Stubičke Toplice, 2020.).



Slika 4b. Pjegavi daždevnjak (*Salamandra salamandra*). L. Pađen (Zagreb, 2022.).

Svi vodozemci i gmazovi u Hrvatskoj zaštićeni su Zakonom o zaštiti prirode iz 2013. godine (NN 80/2013, 15/2018, 14/2019, 127/2019, 155/2023) i Pravilnikom o strogo zaštićenim vrstama (NN 144/2013, 73/2016), i to uglavnom u kategoriji strogo zaštićenih. Hrvatsku faunu vodozemaca odlikuje u europskim razmjerima velik broj vrsta – zabilježeno je oko 20 vrsta vodozemaca. Da bi se zaštitili i očuvali, nužno je očuvati njihova staništa koja su, s obzirom na vrstu, raznolika akvatična (lokve, kanali, močvarna područja ili rukavci rijeka) te terestrična staništa, koja omogućuju sklonište i hranu (Hutinec, 2008.).

### Metamorfoza i hormonska regulacija metamorfoze

Metamorfoza ili preobrazba, period u životnom ciklusu vodozemaca sa znatnim fiziološkim i morfološkim promjenama razvoja iz stadija ličinke u odraslu jedinku, strogo je kontrolirana izlučivanjem hormona štitaste žlijezde (slika 6) (tiroksina i trijodtironina) te hormona kore nuzbubrežne žlijezde – kortikosterona

i hormona prednjeg režnja hipofize – prolaktina. Ovi hormoni kontroliraju brzinu i vrijeme metamorfoze preko inhibicijskih i ekscitacijskih signala koji djeluju preko osi hipotalamus – hipofiza – štitasta žlijezda. Okolišni čimbenici (temperatura, svjetlo, dostupnost hrane) potiču hipotalamus na proizvodnju hormona koji oslobađa tireotropin (engl. *thyrotropin-releasing hormone*, TRH), hormona koji oslobađa kortikotropin (engl. *corticotropin-releasing hormone*, CRH) i hormona koji oslobađa prolaktin (engl. *prolactin releasing hormone*, PRH). Kao odgovor na hipotalamusne hormone, adenohipofiza izlučuje tireotropin (engl. *thyroid-stimulating hormone*, TSH), hormon koji na lučenje potiče štitastu žlijezdu, hormon koji potiče međububrežnu žlijezdu, adrenokortikotropni hormon (engl. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH) i prolaktin. Tireotropin stimulira štitastu žlijezdu punoglavca na proizvodnju trijodtironina (T3) i tiroksina (T4), koji su potrebni za pokretanje i odvijanje metamorfoze, te za pravilan metabolizam, rast i razvoj općenito. Međububrežna žlijezda vodozemaca, pod utjecajem ACTH-a, izlučuje kortikosteron. Kortikosteron centralno stimulira metamorfozu djelujući na hipofizu da oslobodi TSH i ACTH. Kortikosteron također i lokalno stimulira metamorfozu, potičući pretvorbu T4 u T3 i vezanje T3 na receptore. Kortikosteron zatim inhibira metamorfozu tijekom ranog razvoja ličinki, pretpostavlja se putem negativne povratne sprege, što dovodi do smanjenog oslobađanja TSH (Orton i Tyler, 2014.). Prolaktin ima ulogu u udvaranju, reprodukciji, razvoju ličinki vodozemaca, stimuliranju rasta, inhibiranju metamorfoze ličinki nekoliko vrsta vodozemaca te uzrokuje pojavu sekundarnih spolnih karakteristika (Dey i Karar, 2023.).

U ličinki vodozemaca, kao i akvatičnih vodozemaca, paratireoidne žlijezde razvijaju se tek ulaskom u metamorfozu, za čijeg trajanja, posebice pred kraj metamorfoze, paratireoidni hormon stimulira oko-

štavanje hrskavice i cjelokupan razvoj koštano-mišićnog sustava (Srivastav i sur., 1995.).

### Spolni ciklus vodozemaca i hormonska regulacija spolnog ciklusa

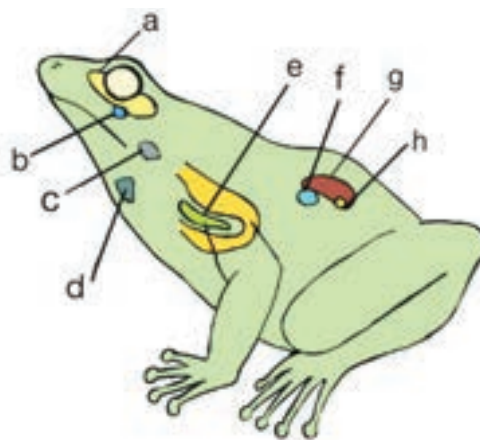
Razmnožavanje vodozemaca kontroliraju, kao i kod ostalih kralježnjaka, hormoni osi hipotalamus – hipofiza – gonade. Glavni su steroidi koji posreduju u razvoju spolnih žlijezda (gonada) i cikličnih promjena tijekom reprodukcije testosteron (T), dihidrotestosteron (DHT) i 17 $\beta$ -estradiol (E2). Hipotalamus izlučuje hormon koji oslobađa gonadotropine (engl. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH). Ovaj hormon u adenohipofizi potiče proizvodnju gonadotropina, folikulostimulacijskog (engl. *follicle-stimulating hormone*, FSH) i luteinizacijskog (engl. *luteinizing hormone*, LH) hormona, koji potom stimuliraju steroidogene enzime koji posreduju u sintezi steroidnih hormona (Norris, 2011.). Os hipotalamus – hipofiza – gonade postaje funkcionalna u žaba kada se tijekom metamorfoze razviju prednji udovi, dok se razvoj testisa i jajnika događa ranije – tijekom razvoja stražnjih ekstremiteta. Spolni hormoni utječu na diferencijaciju gonada te na omjer spolova vodozemaca (Flament i sur., 2011.).

Reproduktivni ciklus mužjaka vodozemaca prati godišnje, sezonske ili ciklične promjene testisa. Pravilno funkcioniranje osi hipotalamus – hipofiza – gonade u mužjaka važno je zbog pravilne steroidogeneze, spermatogeneze i spermiogeneze te pravilnog odgovora Leydigovih i Sertolijevih stanica. Reprodukcijski ciklus ženki ovisi o vrsti i o klimatskoj području neovisno o tome jesu li ženke oviparne, ovoviviparne ili viviparne. Promjene u koncentraciji estrogena i progesterona uvjetuju predvitelogeni, vitelogeni i postvitelogeni fazu reprodukcijskog ciklusa. Hormon rasta zajedno s prolaktinom i estrogenima potiče stanice jetre na proizvodnju vitelogenina (Rastogi i sur., 2011.).

Razumijevanje spolnog ciklusa i metamorfoze vodozemaca važno je zbog prepoznavanja različitih mehanizama kojima kemijski zagađivači iz okoliša uzorkuju endokrinološke poremećaje.

### Kemijski zagađivači iz okoliša i njihov utjecaj na endokrini sustav vodozemaca

Brojna istraživanja potvrđuju kako različiti kemijski zagađivači iz okoliša (engl. *chemical pollutants*) mogu utjecati na reprodukciju, rast, razvoj i opstanak vodozemaca djelujući na endokrini sustav. Kemijski zagađivači iz okoliša definiraju se kao egzogene tvari ili smjese koje mijenjaju funkcije endokrinog sustava



Slika 6. Endokrini organi žabe

i time uzrokuju štetne učinke na zdravlje netaknutog organizma, njegova potomstva ili populaciju (WHO, 2002.; WHO 2012.). Sustavno ispitivanje kemikalija počelo je ilustrirati potencijalan razmjor problema u okolišu. Poznato je više od 800 kemikalija koje mogu ometati hormonske receptore, sintezu hormona ili konverziju hormona uzrokujući pojavu spolno nediferenciranih ili poludiferenciranih jedinki (engl. *intersex*) (Orton i Tyler, 2014.).

Kemijski zagađivači su prirodni ili umjetni elementi ili spojevi, koji uključuju pesticide (herbicide, insekticide, fungicide), teške metale i lijekove. Od 2000. godine povećan je broj istraživanja koja procjenjuju utjecaj kemijskih zagađivača na različite vrste vodozemaca utječući na endokrini sustav te ometaju hormonsku ravnotežu remeteći funkciju štitaste žlijezde i reprodukciju (Pinelli i sur., 2019.).

Vodozemci su izrazito osjetljivi na utjecaj kemijskih zagađivača iz okoliša zbog karakteristično građene propusne kože te životnog ciklusa vezanog uz vodu. Do izlaganja kemijskim zagađivačima može doći na različite načine: raspršivanjem zrakom nošenih čestica zagađivača i/ili neposrednim kontaktom s ostacima zagađivača na tlu i biljnom materijalu. Do bioakumulacije kemijskih zagađivača u vodozemaca može doći i putem hrane biljkama (ličinke) i kukcima (odrasli) (Wagner i sur., 2013.). Za većinu vrsta vodozemaca razdoblje razmnožavanja i razvoja ličnika poklapa se s intenzivnom upotrebom pesticida i gnojiva na poljoprivrednim površinama tijekom proljeća i ljeta.

Pojam kemijskih spojeva koji djeluju kao tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje uveden je u stručnu literaturu relativno nedavno, s prvim znanstvenim člancima objavljenim početkom 90-ih, iako su njihovi učinci zabilježeni i ranije, primarno nakon masovne upotrebe diklor-difenil-trikloretana (DDT)

koji je doveo do velikog opadanja broja mnogih vrsta kralježnjaka (Colborn i sur., 1993.). Neki od tih spojeva svoj negativan utjecaj na okoliš pokazuju i desetljećima nakon prestanka njihova aktivnog odlaganja u okoliš te se svrstavaju pod „zauvijek kemikalije“ (*engl.* forever chemicals; *engl.* persistent organic pollutants) (Garnett i Van Calster, 2021.)

Kemijski zagađivači iz okoliša mogu poremetiti životni ciklus vodozemaca na više načina: (a) smrtonosne koncentracije mogu uzrokovati smrtnost jaja, ličinki ili jedinki u metamorfozi; (b) subletalne koncentracije mogu odgoditi rast i metamorfozu ili smanjiti otpornost jajašca i ličinaka na patogene organizme; (c) poremećaji razvojnih procesa mogu dovesti do smanjenog ili inhibiranog fertiliteta i fekunditeta (Brühl i sur., 2013.).

Pesticidi su, primjerice, poznati kao tvari koje jako remete funkciju štitaste žlijezde te također utječu na metamorfozu vodozemaca (Orton i Tyler, 2014). Dobro je poznata dominantna toksična uloga organofosfornih pesticida povezana s inhibicijom acetilkolinesteraze. U svijetu su provedena istraživanja koja povezuju smanjenje populacije vodozemaca i djelovanja kemijskih zagađivača iz okoliša te su u nekoliko vrsta vodozemaca utvrđene malformacije u poljoprivrednim područjima s intenzivnom upotrebom pesticida i gnojiva (Hayes i sur., 2010.).

### Utjecaj herbicida na endokrini sustav vodozemaca

Učinak herbicida jako ovisi o načinu djelovanja i načinu primjene te na vodozemce može djelovati inhibicijom rasta, diobe stanica ili prouzročenjem deformacija.

Među herbicidima se atrazin (2-kloro-4-etilamino-6-izopropilamino-1, 3, 5-triazin) globalno upotrebljava, posebno za kontrolu travnatih korova, te se pokazalo da povećava apsorpciju natrija kroz kožu u vodozemaca. U vodozemaca uzrokuje smanjenje volumena gonada i zametnih stanica te hermafroditizam, tj. feminiziranje izloženih mužjaka. Mužjaci se ne mogu natjecati za ženke, imaju feminizirane strukture grkljana, smanjenu veličinu spolnih žlijezda, smanjenu količinu i kvalitetu sperme te vrlo nisku plodnost (Hayes i sur., 2010.).

Osim izravnog djelovanja na regulaciju spolnih hormona, zagađivači okoliša mogu neizravno inhibirati reproduktivnu funkciju. Mješavine pesticida koje sadržavaju atrazin mogu povećati razinu kortikosterona u odraslih vodozemaca, koji kronično inhibira reproduktivni razvoj, ponašanje i plodnost (Hayes i sur., 2010.).

Parakvat (1-1'-dimetil-4,4'-bipiridinijev diklorid) i glifosat (N-fosfonometil glicin) također su naširo-

ko korišteni herbicidi. Utvrđeno je da i parakvat i glifosat intenzivno prolaze kroz kožu i ulaze u organizam vodozemaca te uzrokuju štetne učinke. Parakvat i glifosat utječu na steroidogenezu u gonadama. Utvrđeno je da parakvat inhibira proizvodnju testosterona u testisima i proizvodnju 17 $\beta$ -estradiola u jajnicima. Toksičnost parakvata očituje se u stvaranju reaktivnih kisikovih spojeva, što dovodi do smanjene ekspresije i funkcije bjelanjčevina potrebnih za sintezu steroida (Diemer i sur., 2003.).

### Utjecaj insekticida na endokrini sustav vodozemce

Insekticidi se upotrebljavaju ponajprije za suzbijanje kukaca koji napadaju kultivirane biljke ili za uklanjanje kukaca koji prenose bolesti u određenim područjima. Raspršuju se ili posipaju u obliku praha po biljkama i drugim površinama koje posjećuju kukci.

Razine uobičajeno korištenih organoklorinih pesticida (*engl.* organochlorine pesticides, OCP) utvrđene su i u tkivima i u vodenome ekosustavu nekih vrsta vodozemaca. Kod OCP-a je ustanovljena bioakumulacija te je ukupna koncentracija OCP-a pozitivno korelirala s tjelesnom masom odrasle jedinke. Najveća je akumulacija zabilježena u mozgu, nakon čega je slijedila visoka koncentracija utvrđena u ekstremitetima, koži, jetri, skeletnim mišićima, jajnicima i želucu (Fagotti i sur., 2005.; Marlatt i sur., 2022.). Organoklorini insekticidi dovode do smanjene sposobnosti preživljavanja punoglavaca, velike učestalosti abnormalnosti reproduktivnog sustava tj. promjena spola, poremećaja profila steroidnih hormona, smanjenja falusa i poremećene morfologije jajnika (Marlatt i sur., 2022.).

Klorpirifos [0,0-dietil-O-(3,5,6-triklor-2-piridil) fosforotioat] jest organofosfatni insekticid za koji postoje dokazi da uzrokuje endokrinološke poremećaje. Utvrđeno je kako je u nekih vrsta žaba klorpirifos utjecao na diferencijaciju gonada uzrokujući pojavu spolne nediferenciranosti i morfološke promjene testisa (Bernabò i sur., 2011.). Insekticid endosulfan nakon akutne izloženosti dovodi do visokoga mortaliteta, kod subletalnih doza uzrokuje promjene na koži i upalu škrge, a nakon kronične izloženosti uočena je odgođena metamorfoza, koštane deformacije, gubitak tjelesne mase i uginuće (Bernabò i sur., 2008.).

### Utjecaj fungicida na endokrini sustav vodozemce

Fungicidi su vrsta pesticida koji ciljano djeluju na bolesti uzrokovane gljivicama i toksikolozi ih često

zanemaruju dok procjenjuju učinke zagađivača na vodozemce (Ghose i sur., 2014.).

Fungicidi uzrokuju smanjenje stope preživljavanja i rasta, produljuju vrijeme do metamorfoze, povećavaju učestalost deformiteta te dovode do promijenjenog imunskog odgovora. Utvrđeno je da dva široko upotrebljavana fungicida, tebukonazol i pirimetanil, dovode do odgođene metamorfoze, malformacije repa, pojave skolioze, edema te deformacije usta i udova (Bernabò i sur., 2016.).

Tiofanat (fungicid širokog spektra) i tioalofanat spojevi su koji se intenzivno upotrebljavaju u poljoprivredi i vrtlarstvu. Capaldo i suradnici (2006.) utvrdili su kako tiofanat remeti rad endokrinog sustava, utječući na nuzbubrežnu žlijezdu pri vrlo niskim dozama. Autori su utvrdili značajno smanjen broj sekretornih vezikula u kromafinskim stanicama zajedno s razinama serumskog kortikosterona i aldosterona te značajno povećane razine noradrenalina i adrenalina u serumu.

## Uklanjanje kemijskih zagađivača iz prirode

Napredak u procesima pročišćavanja otpadnih voda rezultirao je visokom učinkovitošću uklanjanja različitih opasnih onečišćivača. Neke od tehnologija uklanjanja kemijskih zagađivača iz industrijske otpadne vode jesu tehnologije membranskih pročišćivača, adsorpcija, procesi temeljeni na Fentonovoj reakciji, napredni oksidacijski procesi (engl. *advanced oxidation process*, AOP) te hibridni sustavi kao što su električno poboljšani membranski bioreaktori (engl. *electrically enhanced membrane bioreactors*, eMBR) i sustav integrirane eMBR adsorpcije (Marican i Durán-Lara, 2018.).

Tehnologija membranskih pročišćivača se na temelju veličine pora korištene membrane može klasificirati u mikrofiltraciju (MF), ultrafiltraciju (UF), nanofiltraciju (NF) i reverznu osmozu (RO). Uglavnom služe za uklanjanje teških metala, često uz dodatke adsorbensa (Ahmed i sur., 2022.).

Membranski se bioreaktori koriste kombinacijom aerobnih mikroorganizama i membranske filtracije za uklanjanje metala, uljnih i drugih organskih zagađivača. Adsorpcija i ionska zamjena uspješno se primjenjuju za uklanjanje otpadnih boja, organskih zagađivača i metala. Kao adsorbensi koriste se prirodni (aktivni ugljen, glina, minerali, zeoliti i ruda) i sintetski proizvodi (metalni oksidi, polimerni adsorbensi). Napredni oksidacijski procesi (engl. *advanced oxidation process*) uključuju stvaranje hidroksilnog radikala (OH<sup>•</sup>) koji učinkovito oksidira zagađivače (Ahmed i sur., 2022.).

Proces oksidacije organskih supstrata Fe(II) i vodikovim peroksidom, temeljene na Fentonovoj reakciji, među najučinkovitijim je metodama za oksidaciju organskih zagađivača (Barbusiński, 2009). Reakcija se temelji na stvaranju jakog oksidacijskog sredstva, hidroksilnog radikala (·OH) iz vodikova peroksida (Marican i Durán-Lara, 2018.).

Hibridni sustavi sastoje se od dviju ili više metoda obrade koje se primjenjuju zajedno kako bi se osigurala niža potrošnja energije te viša učinkovitost obrade i/ili kako bi se prevladali izazovi povezani s primjenom samostalne tehnologije.

Saxena i suradnici (2023.) opisali su uklanjanje teških metala, pesticida, farmaceutskog otpada i drugih toksičnih spojeva pomoću površinski aktivnih tvari, koje su jeftiniji i uspješniji način u usporedbi s drugim metodama.

Prema Esplugas i suradnicima (2007.) ozonizacija i primjena aktivnog ugljena u pogonima za pročišćavanje otpadnih voda pokazali su vrlo dobre rezultate u prevenciji ulaska štetnih tvari u ekosustave. Montes-Grajales i Olivero-Verbel (2015.), u cilju bolje detekcije tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje, u suradnji s brojnim institucijama izrađuju 3D bazu svih poznatih tvari za funkciju endokrinog sustava na razini Europske unije. Baza je besplatno dostupna *online*.

## Zakonodavstvo u Europskoj uniji i svijetu

Za identifikaciju i regulaciju potencijalnih i potvrđenih tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje u Europskoj uniji nadležno je više agencija i legislativa, od kojih su najvažnije Europska agencija za kemikalije (engl. European Chemicals Agency, ECHA), Registracija, evaluacija, autorizacija i ograničavanje kemikalija (engl. Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals, REACH) i Strategija kemikalija (engl. Chemicals strategy) (ECHA i EFSA, 2018.).

Među danas zabranjene ili strogo regulirane tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje u Europskoj uniji pripadaju: atrazin, bisfenol A (BPA, zabranjen nakon 2011. godine), ftalati-perfluoroktanska kiselina (PFOA, uklonjena nakon 2010. godine), triklosan (zabranjen u kozmetici nakon 2017. godine), 4-nonilfenol (4-NP, zabranjen nakon 2003. godine u koncentracijama većim od 0.1%), dioksini (strogo regulirani nakon 1991. godine), polibromirani difenil-eteri (PBDE, česti u sredstvima za gašenje požara), bis-2-etilheksil-ftalat (DEHP), metoksiklor, kadmij, glifosfat, klorpirifos, dikamba, endosulfan i brojni drugi.

Jedan od svjetski najrasprostranjenijih pesticida (herbicida), atrazin, zabranjen je za upotrebu u Eu-

ropskoj uniji 2006. godine, ali je u širokoj upotrebi u Sjedinjenim Američkim Državama i Aziji (Sass i Colangelo, 2006.). U Hrvatskoj se kao njegova zamjena često koristi terbutilazin, za koji je također utvrđena visoka toksičnost za žive organizme te je njegova upotreba strogo regulirana na razini Europske unije (Galzina i sur., 2011.).

Supstancije od posebnog interesa za dodatnu kontrolu jesu tzv. „zauvijek kemikalije, poput teflona (engl. *forever chemicals*; engl. *persistent organic pollutants*) nazvane tako zbog svoje dugovječnosti u okolišu te je za njih predložen model „nužne upotrebe” u Europskoj uniji (Garnett i Van Calster, 2021.).

Europska komisija za kemijske supstancije sastavila je i listu potencijalnih tvari koje uzorkuju endokrinološke poremećaje, koja se konstantno obnavlja novim informacijama te trenutačno sadržava više od 110 kemijskih supstancija. Kemikalije koje su dopuštene za upotrebu u Europskoj uniji, a pripadaju pod potencijalne tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje, podijeljene su u različite kategorije (European Commission, 2020.).

Europska strategija za održivost prema okolišu slobodnom od toksina donesena je 2020. godine, a krajnji joj je cilj nulta razina zagađenja okoliša od strane kemijskih zagađivača (European Commission, 2020).

Usprikoš strogim regulacijama u Europskoj uniji, velika količina kemikalija s potencijalom uzrokovanja endokrinoloških poremećaja završi u EU-u krijumčarenjem iz trećih zemalja (Kitowski i sur. 2020.).

## Zaključak

U kemijske zagađivače koji utječu na zdravlje vodozemaca ubrajaju se štetne tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje, a do vodozemaca dolaze upotrebom gnojiva, fungicida, herbicida i drugih pesticida u intenzivnoj poljoprivredi. Kemijski zagađivači iz okoliša utječu na reprodukciju, rast, razvoj i opstanak vodozemaca djelujući na endokrini sustav, posebice na os hipotalamus – hipofiza – spolne žlijezde te negativno utječu na razmnožavanje i metamorfozu i tako dovode do naglog opadanja brojnosti populacija. Kako bi se smanjio utjecaj kemijskih zagađivača, razvijaju se tehnologije pročišćivanja industrijske otpadne vode. Zakonska regulativa upotrebe tvari koje uzrokuju endokrinološke poremećaje nije ujednačena u Europskoj uniji i svijetu, pa je krajnji cilj nulte razine zagađenja okoliša od strane kemijskih zagađivača spor proces.

## Literatura

- AHMED, M., M. O. MAVUKKANDY, A. GIWA, M. ELEKTOROWICZ, E. KATSOU, O. KHELIFI, V. NADDEO, S. W. HASAN (2022): Recent developments in hazardous pollutants removal from wastewater and water reuse within a circular economy. *NPJ Clean Water* 5, 12.
- AKAT, E., M. YENMIS, M. A. POMBAL, P. MOLIST, M. MEGÍAS, S. ARMAN, M. VESELY, R. ANDERSON, D. AYAZ (2022): Comparison of vertebrate skin structure at class level: A review. *Anatom. Rec.* 305, 3543-3608.
- AKAT ÇÖMDEN, E., M. YENMIS, B. ÇAKIR (2023): The complex bridge between aquatic and terrestrial life: skin changes during development of amphibians. *J. Dev. Biol.* 11, 6.
- ANDERSEN, L. W., K. FOG, C. DAMGAARD (2004): Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proc. R. Soc. Lond. B.* 271, 1293-1302.
- AULIYA, M., J. GARCIA-MORENO, B. R. SCHMIDT, D. S. SCHMELLER, M. S. HOOGMOED, M. C. FISHER, F. PASMANS, K. HENLE, D. BICKFORD, A. MARTEL (2016): The global amphibian trade flows through Europe: the need for enforcing and improving legislation. *Biodivers. Conserv.* 25, 2581-2595.
- BARBUSIŃSKI, K. (2009): Fenton reaction controversy concerning the chemistry. *ECES* 16, 347-358.
- BECKER, C. G., C. R. FONSECA, C. F. BAPTISTA HADDAD, R. FERNANDES BATISTA, P. I. PRADO (2007): Habitat split and the global decline of amphibians. *Science* 318, 1775-1777.
- BERNABÒ, I, E. BRUNELLI, C. BERG, A. BONACCI, S. TRIPEPI (2008): Endosulfan acute toxicity in *Bufo bufo* gills: Ultrastructural changes and nitric oxide synthase localization. *Aquat. Toxicol.* 86, 447-456.
- BERNABÒ, I, L. GALLO, E. SPERONE, S. TRIPEPI, E. BRUNELLI (2011): Survival, development, and gonadal differentiation in *Rana dalmatina* chronically exposed to chlorpyrifos. *J. Exp. Zool.* 313A.
- BERNABÒ, I., A. GUARDIA, R. MACIRELLA, S. SESTI, A. CRESCENTE, E. BRUNELLI (2016): Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). *Aquat. Toxicol.* 172, 56-66.
- BERNABÒ, I., V. CITTADINO, S. TRIPEPI, V. MARCHIANÒ, S. PIAZZINI, M. BIONDI, M. IANNELLA (2022): Updating distribution, ecology, and hotspots for

- three amphibian species to set conservation priorities in a European glacial refugium. *Land*. 11, 1292.
- BRÜHL, C. A., T. SCHMIDT S. PIEPER, A. ALSCHER (2013): Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? *Sci. Rep.* 3, 1135.
  - CAMPBELL, L. J., A. H. PAWLIK. X. A. HARRISON (2020): Amphibian ranaviruses in Europe: important directions for future research. *FACETS* 5, 598-614.
  - CAPALDO, A., F. GAY, M. DE FALCO, F. VIRGILIO, S. VALIANTE, V. LAFORGIA, L. VARANO (2006): The newt *Triturus carnifex* as a model for monitoring the ecotoxic impact of the fungicide thiophanate methyl: Adverse effects on the adrenal gland. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 143, 86-93.
  - COLBORN, T., F. S. VOM SAAL, A. M. I. SOTO (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101, 378.
  - CUNNINGHAM, A. A., K. BECKMANN, M. PERKINS, L. FITZPATRICK, R. CROMIE, J. REDBOND, M. F. O'BRIEN, P. GHOSH, J. SHELTON, M. C. FISHER (2015): Emerging disease in UK amphibians. *Vet. Rec.* 176, 468-468.
  - DALBECK, L., M. HACHTEL, R. CAMPBELL-PALMER (2020): A review of the influence of beaver *Castor fiber* on amphibian assemblages in the floodplains of European temperate streams and rivers. *Herpet. Journal.* 30, 135-146.
  - DIEMER, T., J. A. ALLEN, K. H. HALES, D. B. HALES (2003): Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and steroidogenesis. *Endocrin.* 144, 2882-2891.
  - DEY, S., A. KARAR (2023): Regulatory effects of prolactin in amphibians. **SAJEB, 13, 307-327.**
  - ECHA (European Chemicals Agency) i EFSA (European Food Safety Authority) (2018): Outcome of the different consultations with relevant parties on the Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No. 528/2012 and (EC) No. 1107/2009. EFSA supporting publication 2018:1447. 11 pp. doi: 10.2903/sp.efsa.2018.1447; ECHA-18-G-01-EN
  - ESPLUGAS, S., D. M. BILA, L. G. KRAUSE, M. DEZOTTI (2007): Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *J. Hazard. Mat.* 149, 631-642.
  - EUROPEAN COMMISSION (2020): Communication from the commission to the European parliament, the council, the European economic and social committee and the committee of the regions, chemicals strategy for sustainability towards a toxic-free environment. REACH Regulation: Regulation (EC) No 1907/2006.
  - FAGOTTI, A., L. MOROSI, I. DI ROSA, R. CLARIONI, F. SIMONCELLI, R. PASCOLINI, R. PELLEGRINO, G. D. GUEX, H. HOTZ (2005): Bioaccumulation of organochlorine pesticides in frogs of the *Rana esculenta* complex in central Italy. *Amphibia-Reptilia.* 26, 93-104.
  - FALASCHI, M., R. MANENTI, W. THUILLER, G. F. FICETOLA (2019): Continental-scale determinants of population trends in European amphibians and reptiles. *Glob. Chang. Biol.* 504-3515.
  - FLAMENT, S., D. CHARDARD, A. CHESNEL, H. DU-MOND (2011): Sex determination and sexual differentiation in amphibians. U: Norris, D. O., H. Lopez: Hormones and Reproduction in Vertebrates. Academic Press Inc., London; Burlington; San Diego, pp. 209-345.
  - FARQUHAR, M. G., G. E. PALADE (1965): Cell junctions in amphibian skin. *J. Cell Biol.* 26, 263-291.
  - GALLANT, A. L., R. W. KLAVER, G. S. CASPER, M. J. LANNOO (2007): Global Rates of Habitat Loss and Implications for Amphibian Conservation. *Copeia* 4, 967-979.
  - GALZINA, N., Z. OSTOJIĆ, M. GORŠIĆ (2011): Opravdanost zamjene atrazina terbutilazinom. 55. Seminar iz zaštite bilja (Opatija, 8.-11. veljače 2011.). Zbornik sažetaka Glasnik zaštite bilja. Zagreb (49-50).
  - GARNETT, K., G. VAN CALSTER (2021): The concept of essential use: a novel approach to regulating chemicals in the European union. *trans. environ. Law.* 10, 159-187.
  - GHOSE, S. L., M. A. DONNELLY, J. KERBY, S. M. WHITFIELD (2014): Acute toxicity tests and meta-analysis identify gaps in tropical ecotoxicology for amphibians. *Environ. Toxicol. Chem.* 9999, 1-6.
  - HAYES, T. B., P. FALSO, S. GALLIPEAU, M. STICE (2010): The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J. Experiment. Biol.* 213, 921-933.
  - HUTINEC, J. B. (2008): Vodozemci i gmazovi. Priručnik za inventarizaciju i praćenje stanja. Državni zavod za zaštitu prirode.

- JOHOVIC, I., M. GAMA, F. BANHA, E. TRICARICO, P. M. ANASTÁCIO (2020): A potential threat to amphibians in the European Natura 2000 network: Forecasting the distribution of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Biol. Conserv.* 245, 108551.
- KITOWSKI, I., R. ŁOPUCKI, A. STACHNIUK, E. FORMAL (2020): A pesticide banned in the European Union over a decade ago is still present in raptors in Poland. *Environ. Conserv.* 47, 310-314.
- MARICAN, A., E. F. DURÁN-LARA (2018): A review on pesticide removal through different processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 2051-2064.
- MARLATT, V. L., J. MARTYNIUK, S. BAYEN, D. CASTANEDA-CORTÉS, C. D. METCALFE, L. PARENT, G. DELBÉS, A. RWIGEMERA, P. GRIGOROVA, P. THOMSON, V. S. LANGLOIS, G. VAN DER KRAAK (2022): Impacts of endocrine disrupting chemicals on reproduction in wildlife and humans. *Environment. Res.* 208, 112584
- MATTHIESSEN, P., J. R. WHEELER, L. WELTJE (2017): A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations. *Crit. Rev. Toxicol.* 48, 195-216.
- MONTES-GRAJALES, D., J. OLIVERO-VERBEL (2015): EDCs DataBank: 3D-Structure database of endocrine disrupting chemicals. *Toxicol.* 327, 87-94.
- NORRIS, D. O. (2011): Endocrine disruption of reproduction in amphibians. U: Norris, D. O., K. H. Lopez: *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Academic Press, 203-211.
- ORTON, F., C. R. TYLER (2014): Do hormone-modulating chemicals impact on reproduction and development of wild amphibians? *Biol. Rev.* 90, 1100-1117.
- PINELLI, C., A. SANTILLO, G. CHIEFFI BACCARI, S. FALVO, M. M. DI FIORE (2019): Effects of chemical pollutants on reproductive and developmental processes in Italian amphibians. *Mol. Reprod. Dev.* 86, 1324-1332.
- RASTOGI, R. K., C. PINELLI, G. POLESE, B. D'ANIELLO, G. CHIEFFI-BACCARI (2011): *Hormones and Reproductive Cycles in Anuran Amphibians*. U: Norris, D. O., K. H. Lopez: *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Academic Press, 171-186.
- SASS, J., A. COLANGELO (2006): European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. *Int. J. Occup. Environ. Health.* 12, 260-267.
- SILLERO, N., J.C. CAMPOS, A. BONARDI, C. CORTI, R. CREEMERS, P. CROCHET, J. C. ISAILOVIĆ, M. DE-NOËL, G. F. FICETOLA, J. F. GONÇALVES, S. KUZMIN, P. LYMBERAKIS, P. D. POUSS, A. RODRÍGUEZ, R. SINDACO, J. SPEYBROECK, B. A. TOXOPEUS, D. R. VIEITES, M. VENCES (2014): Updated distribution and biogeography of amphibians and reptiles of Europe. *Amphibia-Reptilia* 35, 1-31.
- SAXENA, N., M. ISLAM, S. BALIYAN, D. SHARMA (2023): A comprehensive review on removal of environmental pollutants using a surfactant-based remediation process. *RSC Sustainability* 2148-2161.
- SRIVASTAV, A. K., V. K. DAS, S. DAS, Y. SASAYAMA, N. SUZUKI (1995): Amphibian parathyroids: morphological and functional aspects. *MRT* 32, 79-90.
- TEMPLE, H. J., N. A. COX (2009): European red list of amphibians. Luxembourg: office for official publications of the European Communities.
- TROCHET, A., S. MOULHERAT, O. CALVEZ, V. M. STEVENS, J. CLOBERT, D. S. SCHMELLER (2014): A database of life-history traits of European amphibians. *Biodivers. Data J.* 30, e4123.
- TRUDEAU, V. L., P. THOMSON, W. S. ZHANG, S. REYNAUD, L. NAVARRO-MARTIN, V. S. LANGLOIS (2020): Agrochemicals disrupt multiple endocrine axes in amphibians. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1, 513, 110861.
- VOUTE, C. L., H. H. USSING (1968): Some morphological aspects of active sodium transport. The epithelium of the frog skin. *J. Cell Biol.* 36, 625-638.
- WAGNER, N., W. REICHENBECHER, H. TEICHMANN, B. TAPPESE, S. LÖTTERS (2013): Questions concerning the potential impact of glyphosate based herbicides on amphibians. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1688-7100.
- ZHANG, P., M. H. WAKE (2009): A mitogenomic perspective on the phylogeny and biogeography of living caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Mol. Phylogenet. Evol.* 53, 479-491.
- WHO (2002): *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*, (eds T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock, G. Van Der Kraak) International Program on Chemical Safety, Geneva.
- WHO (2012): *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals* (eds A. Bergman, J. J. Heindel, S. Jobling, K. A. Kidd and R. T. Zoeller), pp. 7-9. International Program on Chemical Safety, Geneva.